

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/75304 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/11,
A61K 39/39, 31/7125, C07H 21/04 // A61K 45/00, A61P
37/04

(74) Mandataire: KERNEIS, Danièle; Direction de la Propriété Intellectuelle, Aventis Pasteur, 2, avenue Pont Pasteur, F-69007 Lyon (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01566

(81) États désignés (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international: 8 juin 2000 (08.06.2000)

(84) États désignés (*regional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07457 8 juin 1999 (08.06.1999) FR
99/10378 6 août 1999 (06.08.1999) FR

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): AVENTIS PASTEUR [FR/FR]; 2, avenue pont Pasteur, F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): BACHY, Monique [FR/FR]; Domaine de la Roche, F-69440 Saint Maurice sur Dargoire (FR). SODOYER, Régis [FR/FR]; La Calmeraie, 5, rue du Brulet, F-69110 Sainte Foy les Lyon (FR). TRANNOY, Emmanuelle [FR/FR]; 26 C, rue des Soeurs Bouvier, F-69005 Lyon (FR).

(54) Title: IMMUNOSTIMULANT OLIGONUCLEOTIDE

(54) Titre: OLIGONUCLEOTIDE IMMUNOSTIMULANT

A1

(57) Abstract: The invention relates to an oligonucleotide which can stimulate human cells of the immune system, characterized in that it comprises at least one nucleotide sequence of formula 5' TTN₁N₂TT3' wherein T represents thymine, and N₁ and N₂ can both represent adenine, thymine, cytosine or guanine. The invention is further characterized in that it is devoid of the CG dinucleotide in which cytosine C is not methylated. One oligonucleotide of particular interest has the following sequence: 5' TTAGTTCT-TAGTTN₃TTAGTT 3'. Said oligonucleotide can be used in a particularly advantageous manner as an adjuvant for vaccines.

WO 00/75304

(57) Abrégé: L'invention concerne un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique ayant la formule suivante 5' T T N₁ N₂ T T 3', dans laquelle T signifie Thymine, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas méthylée. En particulier, un oligonucléotide d'intérêt présente la séquence suivante: 5' TTAGTTCTTAGTTN₃TTAGTT 3'. Un tel oligonucléotide trouve une application particulièrement intéressante comme adjuvant vaccinal.

- 1 -

OLIGONUCLEOTIDE IMMUNOSTIMULANT

La présente invention est relative au domaine des immunostimulants. Plus particulièrement, l'invention concerne des oligonucléotides capables de stimuler des 5 cellules humaines intervenant dans le système immunitaire, et à leur utilisation comme adjuvant vaccinal.

Un grand nombre d'oligonucléotides ont déjà été décrits dans l'art antérieur, en relation avec leurs propriétés immunostimulantes. Ainsi, la demande EP0468520 10 décrit des polynucléotides immunostimulants constitués par un simple brin d'ADN linéaire comprenant de 10 à 100 nucléotides s'enchaînant selon une séquence palindromique.

Selon la demande WO 96/02555, l'activité immunostimulatrice d'oligonucléotides est 15 liée à la présence d'une séquence dinucléotique 5' CG 3', dans laquelle C n'est pas méthylé, l'activité immunostimulante étant plus forte si le motif CG est précédé en 5' du dinucléotide GA et / ou suivi en 3' du dinucléotide TC ou encore TT.

Par contre, selon la demande de brevet WO 98/52962, il n'est pas nécessaire que 20 les oligonucléotides aient un minimum de 8 nucléotides comme cela avait été décrit précédemment, ni que leur séquence soit un palindrome, ni même qu'ils comprennent le dinucléotide CG; ainsi, cette demande décrit les 3 oligonucléotides suivants pour leur utilisation en tant qu'adjuvant vaccinal:
5' GACGTT 3', 5' GAGCTT 3', ainsi que 5' TCCGGA 3'.

25

Selon le brevet US 5,663,153, l'activité immunostimulante d'oligonucléotides n'est pas liée à la séquence des nucléotides, mais à la nature de la liaison entre nucléotides, la présence d'au moins une liaison phosphorothioate permettant d'induire une stimulation du système immunitaire.

30

La plupart des tests de l'art antérieur pour évaluer l'activité immunostimulante des oligonucléotides proposés, sont effectués soit *in vitro* sur des cellules animales

- 2 -

(essentiellement des cellules murines), soit *in vivo* sur des souris. Cependant, les différences existant entre le système immunitaire de la souris et celui de l'être humain, ont conduit à des différences entre les résultats obtenus sur des cellules murines et ceux obtenus sur des cellules humaines. Il n'est donc pas certain que
5 tous les oligonucléotides ayant été décrits comme immunostimulants dans l'art antérieur le soient réellement vis-à-vis de l'être humain.

Or l'industrie pharmaceutique a un grand besoin d'immunostimulants pouvant être administrés à l'homme, notamment dans le domaine des vaccins.

10

La présente invention a donc pour but de proposer des oligonucléotides capables de stimuler des cellules du système immunitaire de l'être humain.

15

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T est la Thymine, et N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas méthylée.

20

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel oligonucléotide pour la fabrication d'un médicament.

25

Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend de 6 à 100 nucléotides.

Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que N₁ représente l'Adénine et en ce que N₂ représente la Guanine.

30

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que le motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété au moins 1 fois.

- 3 -

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que le motif motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété 2 fois.

5 Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que les motifs répétés 5' T T N₁ N₂ T T 3' sont séparés par un nucléotide N₃ qui peut être à chaque fois identique ou différent et qui peut représenter A, C, T ou G.

10 Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que le nucléotide N₃ séparant les 2 premiers motifs TTN₁N₂TT lus lorsque la séquence est orientée 5'→3' représente la Cytosine.

15 Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend la séquence 5' TTAGTTCTTAGTTN₃TTAGTT 3', dans laquelle A représente l'Adénine, T la Thymine, G la Guanine, et C la Cytosine, et dans laquelle N₃ peut signifier A, T, C ou G.

20 Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'induire la prolifération des lymphocytes humains.

25 Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'accroître l'expression du marqueur d'activation CD86 et du récepteur CD25 sur les lymphocytes B humains.

30 Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'induire la sécrétion de cytokines.

L'invention a également pour objet un adjuvant vaccinal caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence

35 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T est la Thymine et, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, l'oligonucléotide étant

dépourvu de séquence dinucléotidique CG dans laquelle la Cytosine C ne serait pas méthylée.

L'invention a également pour objet une composition vaccinale à usage humain
5 comprenant au moins un antigène vaccinal caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T signifie Thymine et, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, l'oligonucléotide étant dépourvu de séquence
10 dinucléotidique CG dans laquelle la Cytosine C ne serait pas méthylée.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, en référence aux figures 1 à 11 qui illustrent les résultats obtenus lors des tests décrits aux exemples 2 à 7.

15 En particulier, les Figures 1 et 2 indiquent le nombre de Coups par Minutes obtenus dans le test de l'Exemple .

Les Figures 3 et 5 indiquent le pourcentage de cellules CD20+ exprimant le récepteur CD25, pour les oligonucléotides obtenus selon l'exemple 1.

De même, les Figures 4 et 6 indiquent le pourcentage de cellules CD20+ exprimant 20 le marqueur CD86.

La Figure 7 indique le nombre de Coups par Minute obtenus dans le test de l'exemple 4.

La Figure 8 indique le pourcentage de cellules CD20+ exprimant le récepteur CD25, pour les oligonucléotides obtenus selon l'exemple 4. De même, la Figure 9 indique le 25 pourcentage de cellules CD20+ exprimant le marqueur CD86.

La Figure 10 indique le nombre de spots mesurés pour la sécrétion d'Interféron γ par des cellules stimulées en présence des oligonucléotides ayant les séquences 9 à 12 décrites à l'exemple 4.

La Figure 11 indique le nombre de spots mesurés pour la sécrétion d'IL10 par des 30 cellules stimulées en présence des oligonucléotides ayant les séquences 9 à 12 décrites à l' Exemple 4.

Par oligonucléotide au sens de la présente invention, on entend un polynucléotide comprenant au moins 6 nucléotides. En effet, contrairement à l'enseignement de l'article intitulé "*CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*", Krieg et al., Nature 1995, on a remarqué qu'il n'était pas nécessaire que l'oligonucléotide ait au moins 8 nucléotides. Par contre, la limite supérieure de la taille des oligonucléotides n'est pas vraiment déterminée. On peut cependant noter que, plus l'oligonucléotide sera long, plus sa purification sera difficile à effectuer lors des étapes de synthèse , et plus le prix de revient en sera élevé. D'autre part, il est probable qu'un oligonucléotide de grande longueur aura plus de difficultés à pénétrer dans les cellules. Aussi, pour les besoins de la présente invention, on considère qu'une limitation de la taille de l'oligonucléotide à 100 nucléotides est appropriée. Cet oligonucléotide est de préférence un oligonucléotide simple brin; il peut s'agir d'un oligodésoxyribonucléotide ou d'un oligoribonucléotide. On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant un oligodésoxyribonucléotide. Les oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester ou, afin d'être plus stables, sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester / phosphorothioates. Les oligonucléotides phosphorothioates sont ceux préférés.

L'oligonucléotide selon l'invention est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire, telles que les lymphocytes B, les lymphocytes T, les monocytes et les cellules dendritiques. Cette stimulation est appréciée notamment par la lymphoprolifération ou par l'expression de marqueurs, tel que le récepteur de cytokine CD25 ou encore le marqueur d'activation CD86 sur les lymphocytes B. Il est possible de sélectionner les oligonucléotides d'intérêt au moyen de tests différents de ceux proposés dans la présente demande, à condition cependant qu'il s'agisse de tests évaluant la capacité de stimulation de cellules humaines, et non pas comme dans la plupart des documents de l'art antérieur, de tests évaluant la capacité de la stimulation de cellules murines. Il serait notamment possible de tester l'expression d'autres marqueurs d'activation des lymphocytes B tels que les marqueurs CD69, ou l'expression de marqueurs de prolifération tels que le marqueur Ki67; des tests relatifs à l'augmentation des marqueurs d'activation et de maturation des cellules

- 6 -

dendritiques pourraient également être utilisés. De même, des tests permettant l'appréciation de l'augmentation de production de certaines cytokines peuvent également être utilisés.

5 Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend au moins une séquence nucléotidique 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T signifie Thymine et, N₁ et N₂ peuvent représenter chacun l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine. Cette formule couvre ainsi 16 possibilités. Cette séquence peut être 5' terminale, 3' terminale ou être entourée par d'autres nucléotides. Elle peut être unique ou répétée
10 10 plusieurs fois à l'identique à l'intérieur d'un même oligonucléotide. Un oligonucléotide selon l'invention peut également comprendre plusieurs séquences différentes correspondant chacune au motif 5' T T N₁ N₂ T T 3'.

Selon l'invention, l'oligonucléotide ne comporte pas de séquence palindromique.

15 Malgré cette absence de séquence palindromique, un tel oligonucléotide est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire.

Selon une caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine ne serait pas méthylée. Cette exclusion
20 s'applique également au motif N₁N₂. La capacité des oligonucléotides de l'art antérieur à être immunostimulants a presque toujours été interprétée comme liée à la présence de motifs CpG non méthylés (Cf. notamment l'article de Krieg et al dans Nature d'avril 1995 cité ci-dessus), cette interprétation étant en cohérence avec l'observation selon laquelle la fréquence de ce dinucléotide était environ 4 fois plus
25 importante dans le génome des bactéries que dans celui des vertébrés. De façon surprenante, on a maintenant trouvé que des oligonucléotides entièrement dépourvus de ce motif dinucléotidique étaient cependant parfaitement capables de stimuler les cellules du système immunitaire humain.

30 Selon un mode de réalisation particulier de la présente invention, le motif N₁N₂ correspond au dinucléotide AG, dans lequel A signifie Adénine et G signifie Guanine.

Selon une caractéristique avantageuse, le motif 5' TTAGTT 3' est répété au moins une fois dans l'oligonucléotide, et de préférence au moins 2 fois. De préférence encore, les motifs répétés sont séparés par au moins un nucléotide N₃, qui représente l'Adénine, la Cytosine, la Guanine ou la Thymine. A l'intérieur d'un
5 oligonucléotide, ce nucléotide de séparation peut être toujours le même, ou être différent à chaque fois. De préférence, le nucléotide séparant les 2 premiers motifs TTAGTT de l'oligonucléotide, (lorsque l'on considère le sens de lecture 5'→3') est constitué par la Cytosine.

De façon particulière, les oligonucléotides dont les séquences nucléotidiques
10 répondent à la formule 5' TTAGTTCTTAGTTN₃TTAGTT 3', dans laquelle N₃ représente A, T, C ou G, sont ceux préférés au sens de la présente invention.

Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu ou appauvri en séquence nucléotidique capable d'inhiber les cellules du système
15 immunitaire humain. En effet, afin d'obtenir un effet global immunostimulant, si des motifs inhibiteurs ou neutralisants tels que, par exemple, ceux décrits dans la demande WO 98/52581 sont présents, il faut que leur effet soit supprimé ou réduit, grâce à la présence d'une séquence à effet immunostimulant plus prononcé, ou grâce à la présence d'un plus grand nombre de séquences 5' T T N₁ N₂ T T 3'.
20

La présente invention a également pour objet un adjuvant vaccinal comprenant au moins un oligonucléotide immunostimulant ayant au moins un motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' tel que mentionné ci-dessus. Par adjuvant vaccinal, on entend un produit qui permet d'accroître ou de modifier la réponse du système immunitaire
25 d'un organisme vis à vis de l'administration d'un antigène. En particulier, il peut s'agir d'une augmentation de la réponse humorale ou de la réponse cellulaire.

L'action d'un adjuvant vaccinal peut également être, non pas une augmentation de la réponse qui se produirait en l'absence d'adjuvant, mais une orientation différente de la réponse produite : par exemple, orientation vers une réponse cellulaire plutôt
30 qu'une réponse humorale, production de certaines cytokines plutôt que d'autres, production de certains types ou sous-types d'anticorps plutôt que d'autres, stimulation de certaines cellules plutôt que d'autres, etc...

L'oligonucléotide immunostimulant de la présente invention peut être utilisé comme adjuvant vaccinal quelle que soit la nature de l'antigène administré et quel que soit le nombre de valences utilisées. Il peut être le seul adjuvant utilisé ou, au contraire,
5 être un élément d'une combinaison adjuvante.

L'action adjuvante de l'oligonucléotide selon l'invention peut être obtenue, soit lorsqu'il est associé à l'antigène ou aux antigènes lors de leur administration, i.e. lorsqu'ils font partie de la même composition vaccinale, soit lorsqu'il est administré séparément de l'antigène ou des antigènes. On préfère cependant l'utiliser dans la
10 même composition vaccinale que l'antigène ou les antigènes à administrer.

L'oligonucléotide selon l'invention peut avantageusement être administré par toutes les voies susceptibles d'être utilisées pour une composition vaccinale: voie muqueuse ou voie systémique.

15 L'un des objets de l'invention est une composition vaccinale comprenant au moins un oligonucléotide immunostimulant ayant une séquence
5' T T N₁N₂ T T 3' telle que décrite ci-dessus.

20 Une composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à l'immunisation contre une seule maladie, ou destinée à l'immunisation contre plusieurs maladies. Il peut s'agir d'une composition vaccinale liquide ou d'une composition lyophilisée. Elle peut comprendre, outre les antigènes, tout ou partie des composants habituellement présents dans un vaccin tels que tampons, stabilisants, conservateurs, ...etc. Elle
25 peut également comprendre un ou plusieurs adjuvant(s) autre(s) que ceux objets de la présente invention. Elle peut également comprendre plusieurs adjuvants objets de la présente invention, constitués soit par des oligonucléotides ayant tous le même motif

30 5' T T N₁N₂ TT 3' mais se différenciant par les nucléotides en 5' et/ou en 3', soit par des oligonucléotides ayant des motifs 5' T T N₁N₂ T T 3' différents, dont les séquences en 5' et en 3' sont identiques ou différentes.

La composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à une administration prophylactique ou à une administration thérapeutique.

La composition vaccinale selon l'invention peut être formulée de manière à optimiser
5 l'action adjuvante de l'oligonucléotide objet de l'invention. Ainsi, l'oligonucléotide peut être couplé à un lipide, tel que le cholestérol ; il peut être intégré dans une émulsion de type huile / eau ou formulé sous forme de liposomes.

Les exemples qui suivent illustrent des modes de réalisation particuliers de la
10 présente invention.

Exemple 1 :Synthèse des oligonucléotides

15 On synthétise 15 oligonucléotides ayant chacun un des motifs suivants :

5' T T A A T T 3'
5' T T A C T T 3'

5' T T A T T T 3'

5' T T A G T T 3'

}

Série A

5' T T T T T T 3'

5' T T T A T T 3'

5' T T T C T T 3'

5' T T T G T T 3'

}

Série T

5' T T C C T T 3'

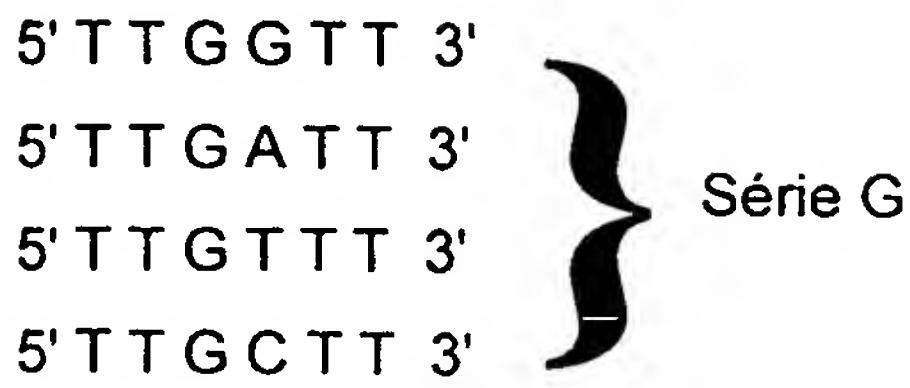
5' T T C A T T 3'

5' T T C T T T 3'

}

Série C

- 10 -



Et ayant 4 Adénine en 5' et 5 Adénine en 3'.

La synthèse de ces oligonucléotides est réalisée au moyen d'un automate synthétiseur fourni par Applied Biosystems qui met en œuvre la méthode chimique standard au phosphoramidite et qui comporte à chaque cycle une étape d'oxydation, qui est réalisée au moyen d'une solution tétraéthylthiuram / acetonitrile pour obtenir une liaison phosphorothioate.

5

10 On prépare en outre, de la même façon, un oligonucléotide A15(S) qui ne comprend que des A et qui est phosphorothioate sur toute sa longueur. Cet oligonucléotide est un témoin négatif car il n'entraîne ni prolifération ni augmentation de l'expression des marqueurs d'activation sur les lymphocytes B.

15 On prépare également un oligonucléotide 3Db(S) dont la séquence est identifiée dans la demande de brevet WO96/02555 sous SEQ ID N°15 (5'GAGAACGCTCGACCTTCGAT3'); cet oligonucléotide comporte des liaisons phosphorothioates sur toute sa longueur et est utilisé comme témoin positif.

20 Tous les oligonucléotides sont maintenus en solution dans du tampon PBS.

Exemple 2 :Test de Lymphoprolifération

On isole des lymphocytes à partir du sang périphérique d'un donneur, en procédant à une centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ces lymphocytes sont ajustés à 2.10^6 5 cellules / ml dans du milieu de culture (RPMI 1640 + 10% de Sérum de Veau Foetal ainsi que de la Glutamine, de la Streptomycine et de la Pénicilline).

Les cellules sont distribuées en plaques 96 puits (fond rond) sous 100 µl, soit 10 2.10^5 cellules par puits. On ajoute ensuite 100µl d'une solution 4µM d'oligonucléotides à tester produites à l'exemple 1 (1 seul type d'oligonucléotide par puits) afin d'obtenir une concentration finale 2 µM.

Les cellules sont incubées pendant 48 à 72 heures.

15 La Thymidine tritiée (Amersham TRK 120) est diluée dans du milieu de culture puis distribuée dans les plaques à raison de 1 µCi par puits sous 50 µl. Après 7 à 8 heures d'incubation à l'étuve (5% CO₂, 37°C), les plaques peuvent être congelées à -80°C et traitées plus tard.
A l'aide du "Harvester", on récolte le contenu des puits sur des plaques Unifilter
20 GF/C et on réalise 6 lavages en eau distillée puis un lavage en éthanol 70% afin de précipiter l'ADN.
Après séchage des plaques, 25 µl de liquide scintillant (Microscint-40, Packard) sont distribués dans chaque puits et permettent de quantifier la radioactivité (rayonnements émis par le tritium) en mesurant le nombre de coups / minute (cpm)
25 émis par chaque puits sur le compteur Top Count (Packard).

Les résultats obtenus pour chacun des oligonucléotides testés sont représentés sur les figures 1 et 2, qui indiquent, pour chaque oligonucléotide testé le nombre de coups par minute; on remarque que tous les oligonucléotides selon l'invention ont un 30 résultat nettement supérieur au résultat obtenu avec le milieu seul ou le témoin négatif A15(S), ce qui signifie qu'ils sont tous capables de stimuler la prolifération des lymphocytes.

Exemple 3 :Test relatif aux marqueurs d'activation

5

Le test est effectué à partir de lymphocytes isolés d'un donneur comme décrit à l'exemple précédent, et ajustés à 2.10^6 cellules/ml dans le même milieu de culture.

Les cellules sont ensuite distribuées en plaques 12 puits sous un volume de 2 ml,
10 soit 4.10^6 cellules / puits. On ajoute dans chaque puits une quantité d'oligonucléotides à tester préparées à l'exemple 1 (1 oligonucléotide / puits) suffisante pour obtenir une concentration en oligonucléotide 2 μ M. Puis les cellules sont incubées pendant 72 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite doublement marquées au moyen de CD25PE / CD20FITC ou CD86PE / CD20FITC puis
15 analysées sur FACScan. Les résultats obtenus sont illustrés sur les figures 3, 4, 5 et 6 qui représentent pour chaque oligonucléotide testé, le pourcentage de cellules B (CD20+) qui expriment le récepteur CD25 (celles qui sont CD25+) ou le marqueur CD86(celles qui sont CD86+). Les résultats représentés sur les figures 3 et 4 ont été obtenus lors d'un test réalisé à un moment différent du test dont les résultats sont
20 illustrés sur les figures 5 et 6, ce qui explique la différence d'ordre de grandeur des résultats obtenus. En effet, dans ce genre de manipulations, les tests sont très variables d'un dosage à l'autre, seuls les résultats obtenus lors d'un même test sont comparables entre eux, d'où la nécessité d'inclure lors de chaque test, un oligonucléotide-témoin ainsi qu'un dosage du milieu seul.

25

On remarque que tous les oligonucléotides objets de l'invention activent les lymphocytes B qui expriment leur marqueur d'activation CD86, ainsi que le récepteur de cytokine CD25.

- 13 -

Exemple 4 :

On prépare, de la même manière qu'à l'exemple 1, une série de 16 oligonucléotides
5 dont les séquences sont les suivantes:

Seq Id 1 : 5' TTAGTTATTAGTTATTAGTT 3'
Seq Id 2 : 5' TTAGTTATTAGTTTTAGTT 3'
Seq Id 3 : 5' TTAGTTATTAGTTCTTAGTT 3'
10 Seq Id 4 : 5' TTAGTTATTAGTTGTTAGTT 3'
Seq Id 5 : 5' TTAGTTTTAGTTATTAGTT 3'
Seq Id 6 : 5' TTAGTTTTAGTTTTAGTT 3'
Seq Id 7 : 5' TTAGTTTTAGTTCTTAGTT 3'
Seq Id 8 : 5' TTAGTTTTAGTTGTTAGTT 3'
15 Seq Id 9 : 5' TTAGTTCTTAGTTATTAGTT 3'
Seq Id 10 : 5' TTAGTTCTTAGTTTTAGTT 3'
Seq Id 11 : 5' TTAGTTCTTAGTTCTTAGTT 3'
Seq Id 12 : 5' TTAGTTCTTAGTTGTTAGTT 3'
Seq Id 13 : 5' TTAGTTGTTAGTTATTAGTT 3'
20 Seq Id 14 : 5' TTAGTTGTTAGTTTTAGTT 3'
Seq Id 15 : 5' TTAGTTGTTAGTTCTTAGTT 3'
Seq Id 16 : 5' TTAGTTGTTAGTTGTTAGTT 3'

Ces oligonucléotides sont de type phosphorothiate sur toute leur longueur.

25

Exemple 5 :

On évalue la capacité qu'ont les oligonucléotides préparés à l'exemple 4 d'induire la
30 prolifération des lymphocytes humains grâce à un test de lymphoprolifération tel que
celui décrit à l'exemple 2. De la même façon qu'à l'exemple 2, la concentration en

oligonucléotide par puits est 2 μ M, et les témoins sont constitués par le milieu seul, l'oligonucléotide A15(S) ainsi que l'oligonucléotide 3Db(S).

Les résultats obtenus, exprimés en Coups par Minute, sont représentés à la Figure 7 qui montre que tous les oligonucléotides selon l'invention sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes et que de particulièrement bons résultats sont obtenus lorsque les séquences des oligonucléotides sont celles identifiées par les Seq Id 9 à 12, i.e. lorsque la Cytosine sépare les 2 premiers motifs TTN₁N₂TT de l'oligonucléotide.

10

Exemple 6 :

On évalue la capacité qu' ont les oligonucléotides préparés à l'exemple 4 d'induire l'expression du marqueur d'activation CD86 et du récepteur CD25 sur les lymphocytes B. Cette évaluation est effectuée grâce au test décrit à l'exemple 3. Les résultats obtenus avec les oligonucléotides préparés selon l'exemple 4 sont représentés sur les Figures 8 et 9 qui illustrent les pourcentages de cellules B (CD20+) qui expriment également le récepteur CD25 (Figure 8) ou le marqueur CD86 (Figure 9).
20 Les résultats obtenus dans ce test confirment ceux obtenus dans le test de lymphoprolifération: tous les oligonucléotides selon l'invention induisent l'expression de marqueurs d'activation sur les lymphocytes B humains; de particulièrement bons résultats sont obtenus lorsque les 2 premiers motifs TTN₁N₂TT de l'oligonucléotide sont séparés par une Cytosine.

25

Exemple 7 :

On évalue la capacité qu' ont les oligonucléotides selon la présente invention à induire la sécrétion de cytokines.
30

Pour cette évaluation, on isole des lymphocytes à partir du sang périphérique d'un donneur, en procédant à une centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ces

- 15 -

lymphocytes sont ajustés à 2.10^6 cellules / ml dans du milieu de culture (milieu AIM V + streptomycine + penicilline).

Les plaques 96 puits ELISPOT (fond plat en nitrocellulose) sont pré-incubées la veille avec une solution d'anticorps de capture de cytokines (IL-10 ou IFN γ suivant le 5 test réalisé), puis saturées avec du milieu de culture.

On distribue ensuite 100 μ l de cellules dans les plaques ELISPOT, soit 2.10^5 cellules par puits, puis on ajoute 100 μ l d'une solution 4 μ M en oligonucléotides à tester, produits selon l'exemple 4 (1 seul type d'oligonucléotide par puits) afin d'obtenir une concentration finale 2 μ M. Le test est réalisé avec les oligonucléotides ayant les 10 séquences décrites sous Seq Id 9, Seq Id 10, Seq Id 11 et Seq Id 12.

Les plaques sont incubées à 37°C, sous atmosphère à 5% de CO₂. Au bout de 72 heures d'incubation, les cellules sont éliminées par lavage en présence de détergent (Tween 1%) et les cytokines fixées sur les anticorps de capture sont révélées par 15 l'addition successive d'anticorps de détection biotynylés (anti-IL-10 ou anti-IFN γ suivant le test réalisé), de streptavidine-HRP, et du substrat AEC.

Les spots (1 spot correspondant à 1 cellule sécrétrice de cytokine) sont compté à l'aide d'un compteur automatique. Les résultats sont exprimés en nombre de spots 20 (nombre de cellules sécrétrices) par million de cellules.

Les résultats obtenus pour chacun des oligonucléotides testés sont représentés sur les figures 10 et 11, qui indiquent, pour chaque oligonucléotide testé le nombre de cellules sécrétrices de cytokines par million de cellules totales ; on remarque que 25 tous les oligonucléotides selon l'invention ont un résultat nettement supérieur au résultat obtenu avec le milieu seul ou le témoin négatif A15(S), ce qui signifie qu'ils sont tous capables d'induire la sécrétion de cytokines, notamment d'IL 10 et d'Interféron γ .

Revendications

1. Oligonucléotide immunostimulant , caractérisé en ce qu'il comprend au moins
5 une séquence nucléotidique ayant la formule suivante
5' TTN₁N₂TT 3', dans laquelle T signifie Thymine, N₁ et N₂ peuvent chacun
représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, et en ce qu'il est
dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas méthylée.
- 10 2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend de 6 à
100 nucléotides.
3. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce que N₁ représente
l'Adénine et en ce que N₂ représente la Guanine.
- 15 4. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que
le motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété au moins 1 fois.
5. Oligonucléotide selon la revendication précédente caractérisé en ce que le motif
20 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété 2 fois.
6. Oligonucléotide selon une des revendications 4 et 5, caractérisé en ce que les
motifs répétés 5' T T N₁ N₂ T T 3' sont séparés par un nucléotide N₃ qui peut
être à chaque fois identique ou différent et qui peut représenter A, C, T ou G.
- 25 7. Oligonucléotide selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le
nucléotide N₃ séparant les 2 premiers motifs T T N₁ N₂ T T lus lorsque la
séquence est orientée 5'→3' représente la Cytosine.

- 17 -

8. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'il comprend la séquence 5' TTAGTTCTTAGTTN₃TTAGTT 3', dans laquelle A représente l'Adénine, T la Thymine, G la Guanine, et C la Cytosine, et dans laquelle N₃ peut signifier A, T, C ou G.
5
9. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la prolifération des lymphocytes humains.
10. 10. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la sécrétion de cytokines.
15
11. Oligonucléotide selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la sécrétion d'IL 10.
12. Oligonucléotide selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la sécrétion d'Interféron γ.
13. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'accroître l'expression du marqueur d'activation CD86 sur les lymphocytes B humains.
20
14. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'accroître l'expression du récepteur de cytokine CD25 sur les lymphocytes B humains.
25
15. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications précédentes pour la fabrication d'un médicament.
- 30 16. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un immunostimulant humain.

- 18 -

17. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un adjuvant vaccinal.

18. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10, pour la 5 fabrication d'une composition vaccinale.

19. Composition vaccinale à usage humain, comprenant au moins un antigène vaccinal, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10

- 2 -

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
5 <220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 4
ttagttatta gttgttagtt 20
10

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 5
20 ttagtttta gttattagtt 20

<210> 6
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
30 <400> 6
ttagtttta gtttttagtt 20

<210> 7
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
40 oligonucleotide
<400> 7
ttagtttta gttcttagtt 20

- 3 -

5 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 8
10 ttagtttta gttgttagtt 20

15 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 9
20 ttagttctta gttattagtt 20

25 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 10
30 ttagttctta gtttttagtt 20

35 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 11
40 ttagttctta gttcttagtt 20

- 4 -

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 12
10 ttagttctta gttgttagtt 20

<210> 13
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
20 <400> 13
ttagttgtta gttatttagtt 20

<210> 14
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
30 <400> 14
ttagttgtta gtttttagtt 20

<210> 15
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
40 <223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 15
ttagttgtta gttcttagtt 20

- 5 -

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 16
10 ttagttgtta gttgttagtt 20

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/11	A61K39/39	A61K31/7125	C07H21/04	//A61K45/00,
		A61P37/04			

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIANG, H. ET AL.: "Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides" J. CLIN. INVEST. (1996), 98(5), 1119-1129, XP002130608 the whole document ---	1,2,4-6, 9,13-19
X	WO 95 26204 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 5 October 1995 (1995-10-05) cited in the application page 13, line 8 -page 14, line 22 page 17, line 35 -page 19, line 9 ---	1,2,9, 10,15-19
A	WO 98 37919 A (UNIV IOWA RES FOUND) 3 September 1998 (1998-09-03) page 13, line 7 -page 14, line 13 example 5 ---	1,2, 9-12, 15-19

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 October 2000

Date of mailing of the international search report

10/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01566

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOGGS, R. ET AL.: "CHARACTERIZATION AND MODULATION OF IMMUNE STIMULATION BY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES." ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, vol. 7, October 1997 (1997-10), page 461-471 XP002053418 ISSN: 1087-2906 page 467; figures 5,6 table 2	
A	KRIEG A M ET AL: "CPG MOTIFS IN BACTERIAL DNA TRIGGER DIRECT B-CELL ACTIVATION" NATURE, vol. 374, page 546-549 XP000197060 ISSN: 0028-0836 cited in the application	
P, X	PARRONCHI, P. ET AL.: "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors" J. IMMUNOL. 163(11), 5946-5953, 1 December 1999 (1999-12-01), XP002130609 page 5947; table I page 5950, right-hand column, line 9 - last line page 5952, right-hand column	1,2,9, 10,12, 15-19
P, X	LANG R ET AL: "GUANOSINE-RICH OLIGODEOXYNUCLEOTIDES INDUCE PROLIFERATION OF MACROPHAGE PROGENITORS IN CULTURES OF MURINE BONE MARROW CELLS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 29, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 3496-3506, XP000876859 ISSN: 0014-2980 page 3501; table 2	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01566

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9526204 A	05-10-1995	US 5663153 A	US 5723335 A	02-09-1997 03-03-1998
WO 9837919 A	03-09-1998	AU 6667498 A		18-09-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01566

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 7 C12N15/11 A61K39/39 A61K31/7125 C07H21/04 //A61K45/00,
 A61P37/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LIANG, H. ET AL.: "Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides" J. CLIN. INVEST. (1996), 98(5), 1119-1129, XP002130608 le document en entier ---	1,2,4-6, 9,13-19
X	WO 95 26204 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 5 octobre 1995 (1995-10-05) cité dans la demande page 13, ligne 8 -page 14, ligne 22 page 17, ligne 35 -page 19, ligne 9 ---	1,2,9, 10,15-19
A	WO 98 37919 A (UNIV IOWA RES FOUND) 3 septembre 1998 (1998-09-03) page 13, ligne 7 -page 14, ligne 13 exemple 5 ---	1,2, 9-12, 15-19



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No
PCT/FR 00/01566

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BOGGS, R. ET AL.: "CHARACTERIZATION AND MODULATION OF IMMUNE STIMULATION BY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES." ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, vol. 7, octobre 1997 (1997-10), page 461-471 XP002053418 ISSN: 1087-2906 page 467; figures 5,6 tableau 2</p> <p>---</p> <p>KRIEG A M ET AL: "CPG MOTIFS IN BACTERIAL DNA TRIGGER DIRECT B-CELL ACTIVATION" NATURE, vol. 374, page 546-549 XP000197060 ISSN: 0028-0836 cité dans la demande</p> <p>---</p> <p>PARRONCHI, P. ET AL.: "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors" J. IMMUNOL. 163(11), 5946-5953, 1 décembre 1999 (1999-12-01), XP002130609 page 5947; tableau I page 5950, colonne de droite, ligne 9 - dernière ligne page 5952, colonne de droite</p> <p>---</p> <p>LANG R ET AL: "GUANOSINE-RICH OLIGODEOXYNUCLEOTIDES INDUCE PROLIFERATION OF MACROPHAGE PROGENITORS IN CULTURES OF MURINE BONE MARROW CELLS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 29, no. 11, novembre 1999 (1999-11), pages 3496-3506, XP000876859 ISSN: 0014-2980 page 3501; tableau 2</p> <p>---</p>	1,2,9, 10,12, 15-19
P,X		1-3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dépôt international No

PCT/FR 00/01566

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9526204 A	05-10-1995	US 5663153 A US 5723335 A	02-09-1997 03-03-1998
WO 9837919 A	03-09-1998	AU 6667498 A	18-09-1998